

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-191977

(43) 公開日 平成10年(1998) 7月28日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	A
C 0 7 K 14/47		C 0 7 K 14/47	
C 1 2 N 1/21		C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P 21/02		C 1 2 P 21/02	C
// (C 1 2 N 1/21			
審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 9 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平9-4489	(71) 出願人	000103840 オリエンタル酵母工業株式会社 東京都板橋区小豆沢 3 丁目 6 番 10 号
(22) 出願日	平成 9 年 (1997) 1 月 14 日	(71) 出願人	591253227 淀井 淳司 京都府京都市左京区北白川西瀬ノ内町39
		(72) 発明者	淀井 淳司 京都府京都市左京区北白川西瀬の内町39
		(74) 代理人	弁理士 社本 一夫 (外 5 名)

(54) 【発明の名称】 チオレドキシンの改変体及び該改変体を含むAP-1の転写活性を増強する因子

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、非還元条件下において安定であることを特徴とするチオレドキシンの改変体、並びに前記チオレドキシンのR₁とを含むAP-1転写活性増強因子を提供することを目的とする。

【解決手段】 本発明のチオレドキシンの改変体は、活性中心のCys残基は修飾せず、それ以外のCys残基を少なくとも1つないし全て他のアミノ酸残基に置換することを特徴とする。さらに、本発明のAP-1転写活性増強因子は、前記チオレドキシンのR₁とがS-S結合で結合してなる。

BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項1】 チオレドキシンの有する活性中心のCys残基は修飾せず、それ以外のCys残基を少なくとも1つないし全て他のアミノ酸残基に置換することにより、非還元条件下において安定にしたことを特徴とするチオレドキシン改変体。

【請求項2】 請求項1に記載のチオレドキシンとRel-1とがS-S結合で結合してなるAP-1の転写活性性能を増強する因子。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、非還元条件下においても酸化的条件下においても安定であるチオレドキシン改変体に関する。

【0002】本発明は、さらに前記チオレドキシン改変体を含む、AP-1の転写活性性能を増強する因子に関する。

【0003】

【従来の技術】近年、増殖及び細胞死を含む細胞内現象は、細胞内酸化還元状態によって調節されるということを示唆する一連の証拠が次々と挙がっている(Pahl, H.L. & Baeuerle, P.A. (1994) *BioAssays* 16, 497-502)。特に、チオール酸化還元調節機構によって制御される転写因子が試験管内ゲルシフト試験によって、次々と挙げられている(Matthews, J.R., Wakasugi, N., Virelizier, J.L., Yodoi, J. & Hay, R.T. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20, 3821-30.; Abate, C., Patel, L., Rauscher, F. J. d. & Curran, T. (1990) *Science* 249 1157-1161)。これには、AP-1、NF- κ B、Dorsal/Relファミリーの他のメンバー、Myb及びEts等の既知の転写因子が含まれている。しかしながら、これらの転写因子の活性制御については、2-MEやDTTのような化学試薬が転写因子のDNA結合能を活性化することがわかっているが、細胞内のどの分子が酸化還元制御因子として働くかという問題は、まだ明らかにされていない。

【0004】細胞内の酸化還元制御因子の有力な候補としてチオレドキシン(以下、「TRX」という)が注目されている。TRXは生体内に普遍的に存在する小さいタンパク質で、2つのシステインを有する部位-Cys-Gly-Pro-Cys-を活性中心に有し(Laurent, T.C., Moore, E.C., & Reichard, P. (1964) *J. Biol. Chem.* 239, 3436-3444; Holmgren, A. (1989) *Ann. Rev. Biochem.* 54, 237-271; Holmgren, A. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 13963-13966; B

uchanan, B.B., Schurmann, P., Decottignies, P. & Lozano, R.M. (1994) *Arch. Biochem. Biophys.* 314, 257-60)、活性中心にあるジチオールの可逆的な酸化を通して酸化還元反応に関わる多面発現性の細胞性因子である。TRXは還元型及び酸化型のどちらでも存在し、遺伝子発現を含む細胞内現象の制御に重要な役割を果たしていると考えられている。また、HTLV-1白血病発生に関与する成熟T細胞白血病由来因子(ADF)としても知られている。TRXは細胞内(Matthews, J.R.ら、1992, 上述; Okamoto, T., Ogiwara, H., Hayashi, T., Mitsui, A., Kawabe, T. & Yodoi, J. (1992) *Int. Immunol.* 4, 811-9)及び細胞外で機能する。細胞内での機能の1つは、タンパク質-スクレオチド間相互作用を促進することが知られている。

【0005】NF- κ Bは κ L鎖遺伝子の転写の活性化に関与していると考えられる転写因子である。NF- κ Bのp50サブユニットの62位のCys残基をTRXが還元することによって、p50のDNA結合活性及び転写活性が増大することが、*in vitro*及び*in vivo*の実験によって示されていた。最近、NF- κ B p50から得たオリゴペプチドとTRXとが直接的な物理的結合をすることがNMRによる試験管内実験によって明らかになった。しかしながら、これらの生体内での直接的な結合はまだ検証されていない。

【0006】また、同じく転写因子の一種であるAP-1も酸化還元によって制御されるということが示唆されている。AP-1はニワトリ肉腫ウィルス(v-jun)の細胞内プロトタイプとしての癌原遺伝子(c-jun)の遺伝子産物であり、二量体を形成して特異的DNA塩基配列(TGACTCA)に結合するほか、ある種のcAMP response element; CREにも結合してその転写制御活性を発現する。また、fos関連遺伝子産物Fosとロイシンジッパー構造を介して安定な二量体を形成することにより、AP-1としての転写活性性能が著しく増強される(免疫学用語辞典 第三版 多田富雄 他編、1993年12月1日発行)。当該AP-1の転写活性化能については、種々の抗酸化剤が、そのDNA結合能及び活性化能を強く活性化することが知られており(Pahl, H.L.ら (1994) 上述 等)、酸化還元によって制御されと考えられている。

【0007】しかしながら、NF- κ Bとは異なり、AP-1はTRXの直接的な基質ではない(Xanthoudakis, S., Miao, G., Wang, F., Pan, Y.C. & Curran, T. (1992) *EMBO J.* 11, 3323-35)。さらにAP-1のシステインの周囲の配列は、NF- κ Bとは全く異なる。

っている(Okuno, H., Akahori, A., Sato, H., Xanthoudakis, S., Curran, T. & Iba, H. (1993) *Oncogene* 8, 695-701; Ng, L., Forrest, D. & Curran, T. (1993) *Nucleic Acids Res.* 21, 5831-5837)。よって、転写因子AP-1の酸化還元制御の機構はNF- κ Bとは異なり、TRX以外の分子の存在を必要とすると考えられる。このような分子として酸化還元因子1(以下、「Ref-1」という)が挙げられる

(Xanthoudakis, S. & Curran, T. (1992) *EMBO J.* 11, 653-65; Xanthoudakis, S., Miao, G. G. & Curran, T. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 23-7)。Ref-1はAP-1のDNA結合を回復させる因子の1つとして無細胞系において同定されたタンパク質であり、APエンドヌクレアーゼと同一であることが分かっている。

【0008】即ち、AP-1の酸化還元制御には、TRXとRef-1の2つの因子の存在が必要であることは知られていた。しかしながら、AP-1の転写活性促進の詳細な機構は明らかにされておらず、TRXとRef-1とが直接的に結合するのか、それとも相互作用にさらに別の介在因子が必要なのか等に関する報告も本発明前にはなかった。さらに、TRXは分子内に複数のシステイン残基を有するために、多量体を形成し沈殿しやすいので取り扱いにくいという問題があった。従って、その必要性が高かったにもかかわらず、有用なAP-1の転写活性を増強する因子は得られていなかった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、TRXの有する活性中心のCys残基は修飾せず、それ以外のCys残基を少なくとも1つないし全て他のアミノ酸残基に置換することにより、非還元条件下において安定であるTRXを提供することを目的とする。

【0010】本発明は、さらに前記TRXとRef-1とがS-S結合で結合させた、AP-1の転写活性を増強する因子を提供することを目的とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記問題解決のため鋭意研究に努めた結果、TRXはRef-1と直接結合してAP-1転写活性を促進すること、そして前記結合にはTRX中の活性部位のCys残基が重要であることを明らかにした。

【0012】そして、活性中心となる当該Cys残基は修飾せず、それ以外のCys残基を少なくとも1つないし全て他のアミノ酸残基に置換することにより、非還元条件下において安定であるTRXを提供した。さらに、前記TRXをRef-1とS-S結合で結合させた、AP-1の転写活性を増強する因子の提供を可能とし

た。以下、本発明を詳細に説明する。

【0013】本発明者らは、*in vivo*においてTRXおよび/またはRef-1の過剰発現がAP-1の転写活性に与える影響を調べた(実施例1)。その結果、AP-1の転写活性誘導因子である12-O-テトラデカノイルホルボール-13-酢酸(PMA)で処理を行ったHeLa細胞において野生型TRXとRef-1を共発現させた場合、対照と比較し約4倍の転写活性を示した(図2、レーン2)。野生型TRXまたはRef-1のみを発現させた場合、転写活性は対照の約1.5-2.0倍となった(図2 レーン5および1)。従って、TRXとRef-1は共同してAP-1の活性を促進すると考えられる。

【0014】このことは、TRXおよびRef-1の細胞内局在性によっても裏付けられる。細胞を転写活性誘導因子、例えばPMAで処理する場合、TRXは処理前には細胞質内に存在するが、処理後は核内に移動する。そして、Ref-1は処理の前後共に核内に存在する(実施例2)。従って、細胞を転写活性誘導因子で処理を行うとTRXとRef-1は共に核内に局在する。

【0015】さらに、本発明者らはAP-1の転写活性促進に際し、TRXとRef-1とが直接に結合しているのか、あるいは何らかの介在因子の存在が必要であるのかを調べた。TRXタンパク質は、その分子内に数個のシステイン残基を有する。例えば、図1に示すようにヒトTRXの場合、32位、35位、62位、69位および73位の5箇所にシステイン残基がある。このうち、32位と35位の2つのシステインを有する部位-Cys-Gly-Pro-Cys-が酸化還元活性部位であることが知られている(Laurent, T. C. ら, 1964 上述; Holmgren, A. *Ann. Rev. Biochem.* 1989 上述; Holmgren, A. *J. Biol. Chem.* 1989 上述; Buchanan, B. B. ら 1994 上述)。本発明者らは、これらのシステイン残基を変異させたTRX突然変異体を作成し、Cys酸化によって-SH基を-S-S-結合に変える架橋試薬を用いてTRXとRef-1とは直接に結合していること、さらにTRXとRef-1との結合には特に活性部位のCys32残基が関与していることを明らかにした。

【0016】具体的には、野生型のTRXとRef-1とを酸化条件下で混合すると、野生型TRX-Ref-1複合体を形成し、TRXとRef-1の合計分子量である約50kDaに野生型TRX抗体およびRef-1抗体で反応するバンドが生じる。さらに、TRXの突然変異体として、TRXC35A(ヒトTRXの35位のシステイン残基をアラニンに変換させたもの)、TRXC32S/C35S(ヒトTRXの32および35位のシステイン残基をセリンに変換させたもの)、並びにTRXC62S/C69S/C73S(ヒトTRXの62、69および73位

のシステイン残基をセリンに変換させたもの)を作成して、これらの突然変異体とRef-1との結合を調べた(実施例3)。TRXC35AおよびTRXC62S/C69S/C73Sは野生型の場合と同様にRef-1に結合した(図4レーン4および8)。しかしながら、TRXC32S/C35Sの場合Ref-1との結合体は形成されなかった(図4レーン6)。

【0017】これらのことから、TRXはRef-1と直接的に結合することでAP-1の転写活性を制御すること、即ち、TRXはRef-1のプロトン供与体の1つであることが明らかにされた。さらに、TRXとRef-1の結合には、TRXの活性中心を構成するCys32およびCys35、特にCys32が関与していることがわかった。

【0018】さらに本発明者らは、哺乳類ツーハイブリッド法を利用して*in vivo*でのTRXとRef-1との結合を検出することに成功した(実施例4)。ツーハイブリッド検定法でレポーター遺伝子の発現が検出されれば、2つの融合タンパク質は生きた細胞の核内で互いに結合していることが示唆される。より具体的には、野生型TRXとRef-1を共発現させた場合、レポーター遺伝子の発現はコントロールの10倍に上昇した(図6レーン5および6)。TRXC62S/C69S/C73Sの場合も野生型とほぼ同程度にレポーター遺伝子が発現した。それに対し、TRXC35Aでは、レポーター遺伝子の発現は野生型の場合の半分弱になり(図7レーン4)、TRXC32S/C35Sでは発現は誘導されなかった(レーン3)。従って、*in vivo*においてもTRXとRef-1は、TRXの活性中心であるCys32およびCys35、特にCys32を介して結合していることが本発明により明らかにされた。

【0019】また、出願人はTRXのC末端を欠失させたTRXΔ87(ヒトTRXの88位-104位を欠失したもの)変異体を作成し、上述した哺乳類ツーハイブリッド法によりRef-1との結合を調べた。その結果、COOH末端を欠いたTRX変異体及びRef-1融合構築物を同時発現させても、レポーター遺伝子の顕著な誘導は観察されなかった(図7レーン6)。この結果は、TRXの還元活性とTRXのRef-1との相互作用にTRXのCOOH末端が不可欠であることを示唆している。

【0020】以上に記載したとおり、TRXとRef-1は直接結合してAP-1の転写活性能力を促進すること、さらに、当該結合にはTRXの活性部位のCys残基、例えばヒトTRXではCys32およびCys35、特にCys32が必要であることが初めて明らかにされた。これらのTRXの活性中心であり、かつRef-1との直接結合に関与するCys残基を保存し、その他のCys残基を他のアミノ酸残基に置換すれば、非還元条件下においてRef-1と結合し、かつ、不必要な

S-S結合をせず多量体を形成しない安定なTRXを得ることができる。よって、本発明のTRX改変体はTRXの有する活性中心のCys残基は修飾せず、それ以外のCys残基を少なくとも1つないし全て他のアミノ酸残基に置換することにより、非還元条件下において安定であることを特徴とする。

【0021】活性および結合に必要なCys残基は、例えばヒトのTRXでは32位と35位のCys残基である。当業者は本明細書の記載に基づいて、ヒト以外のTRXについても、その活性および結合に必要なCys残基を容易に判断することができる。

【0022】本発明のTRXの改変体は慣用された遺伝子工学技術によって得ることができる。例えば、TRXのアミノ配列および塩基配列は公知であり、複数の文献にも記載されているので(Laurent, T. C. ら, 1964 上述; Holmgren, A. Ann. Rev. Biochem. 1989 上述; Holmgren, A. J. Biol. Chem. 1989 上述; Buchanan, B. B. ら 1994 上述)、これらの文献に基づき、適切なcDNAライブラリーから天然のTRXをコードするcDNAを得ることができる。これに例えば、周知技術である部位特異的変異誘発(例えば、Nucleic Acid Research, Vol. 10, No. 20, p. 6487-6500, 1982)を施すことにより、本発明の改変体を得ることができる。

【0023】部位特異的変異誘発法は、例えば、所望の変異である特定の不一致の他は、変異を受けるべき一本鎖ファージDNAに相補的な合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いて次のように行うことができる。即ち、プライマーとして上記合成オリゴヌクレオチドを用いてファージに相補的な鎖を合成させ、得られた二本鎖DNAで宿主細胞を形質転換する。形質転換された細菌の培養物を寒天にプレートし、ファージを含有する単一細胞からプラークを形成せしめる。すると、理論的には50%の新コロニーが一本鎖として変異を有するファージを含有し、残りの50%が元の配列を有する。上記所望の変異を有するDNAと完全に一致するものとはハイブリダイズするが、元の鎖を有する不一致のものとはハイブリダイズしない温度において、得られたプラークをラジオアイソトープ等で標識された合成プローブとハイブリダイズさせる。次に該プローブとハイブリダイズするプローブを拾い、培養しDNAを回収する。

【0024】本発明のTRX改変体は活性中心のCys残基は置換せず、それ以外のCys残基を少なくとも1つないし全て他のアミノ酸残基に置換することの特徴とする。従って、それ以外のアミノ酸残基について天然のTRXのアミノ酸配列中の1又は複数のアミノ酸が欠失、付加、または置換された場合であっても、TRXのAP-1生理活性促進能、およびRef-1への結合能

力を有するものであれば、本発明の範囲に含まれることは明らかである。これらのアミノ酸が欠失、付加、または置換は、例えば、上述した部位特異的変異誘発法によって行うことができる。

【0025】本発明はさらに上述したTRX改変体とRef-1とがS-Sで結合してなるAP-1転写活性促進因子を提供する。本発明のAP-1転写活性促進因子中のTRX改変体は、活性部位以外のCys残基はS-S結合を形成しないように他のアミノ酸残基に置換されるため、多量体を形成せず非還元条件下で安定である。

【0026】以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の技術的範囲を限定するためのものではない。当業者は本明細書の記載に基づいて容易に本発明に修飾、変更を加えることができ、それらは本発明の技術的範囲に含まれる。

【0027】

【実施例】後述する実施例では、以下の材料および方法を採用した。

【0028】細胞及び細胞培養

10%ウシ胎児血清及び抗生物質を加えたDMEM (Gibco BRL, Gaithersburg, USA) 中で、湿度95%、空気中CO₂濃度5%、37℃の条件でHeLa細胞及びCOS7細胞を培養した。

【0029】試薬

12-O-テトラデカノイル-ホルボール-13-酢酸 (PMA) は、Sigma Chemicals Co., St. Louis, MOから購入した。抗TRX単クローン抗体、11-mAb及び21-mAbは、Fujirebio Inc., Tokyo, Japanによって製造され、提供された。抗Ref-1ポリクローン抗体は、Santa Cruz Biotechnology Inc. Palo Alto, USAから購入した。

【0030】TRXの突然変異誘発及びトランスフェクション

ヒトTRXの突然変異誘発はPCRに基づく方法で行い、配列が正しいことをDNAシーケンスによって確認した(図1)。発現プラスミドの細胞への導入は、リポフェクトアミン試薬 (GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD) によって、Opti-MEM (GIBCO/BRL) を用いて製造社の手引に従って行った。

【0031】-73/+63 Col (ヒトコラゲナーゼ1)-LUCを用いたルシフェラーゼ検定
pGL2-Basic (Promega) 及びpBLCAT3に入った-73/+63 Col (Angel, P., Baumann, I., Stein, B., Delius, H., Rahmsdorf, H.J. & Herrlich, P. (1987) Mol. Cell Bi

ol. 7, 2256-2266) から-73/+63 Col-LUCを作製した。HeLa細胞を6穴プレートに1穴当たり 4×10^5 細胞になるようにまいた。発現プラスミドを、リポフェクトアミン試薬を用いて細胞に導入した。それぞれの導入に当たっては、1 μ gの野生型pCDSR α -TRXまたは-TRX^{C32S/C35S}発現プラスミド (Tagaya, Y., Maeda, Y., Mitui, A., Kondo, N., Masutani, H., Mamuro, J., Brown, N., Arai, K., Yokota, T., Wakasugi, H. & Yodoi, J. (1989) EMBO J. 8, 757-764)、及び/または1 μ gのpRC/CMV-Ref-1発現ベクターを、1 μ gの-73/+63 Col-LUCと共に用いた。DNAの全量は、pRC/CMV (Invitrogen, San Diego, CA) を加えて3 μ gになるように調整した。16時間培養した後、PMA (30ng/ml) を加え、細胞を24時間培養した。30時間後に細胞を回収し、市販の検定法 (Promega, Madison, WI) を用いて、蛍光光度計でルシフェラーゼ活性を決定した。誘導されたルシフェラーゼ活性の相対比を計算した。

【0032】組み換えタンパク質の細菌内での発現

ヘキサヒスチジン (6×His) 標識と融合した種々のTRX組み換えタンパク質を、pQE30発現プラスミド (Qiagen, Chatsworth, CA) を用いて大腸菌内で発現させた。大腸菌株のM15 [pRep4] にそれぞれのpQE-TRX発現ベクターを形質転換した。A600が0.7になるまで大腸菌を37℃で激しく振とう培養し、1mM IPTGで3時間処理した。ペレットにした細胞を1mg/ml リゾチーム、10mM 2-メルカプトエタノール、1mM PMSF、50 μ M TLCK、及び0.8mMイミダゾールを含むPBS (-) 中で溶解させ、超音波処理して破砕した。溶解液を遠心して不純物を除いた。6×His-TRXを含む粗製溶解液をNi²⁺-NTAアガロースカラムに通した。カラムを洗い、80mMイミダゾールを含むPBSで融合タンパク質を溶出させた。溶出したタンパク質を2mM DTTを含むPBSに対して透析した。ヒトRef-1は、6×His標識タンパク質として、pDS56ref-1 (Xanthoudakis, S.ら、1994、上述) (Xanthoudakis, S. より供与) によって発現させた。ここでは、Ref-1溶出液を保存用緩衝液 [50mMリン酸ナトリウム、pH7.3/50mM NaCl/5mM MgCl₂/1mM EDTA、5% (vol/vol) グリセロール] に対して透析した以外は、TRXと同じ方法に従った。

【0033】試験管内ジスルフィド架橋相互作用検定

6×His-TRX (200ng) 及び6×His-R

ef-1 (200 ng) を、1mMDTTと室温 (RT) で30分間保温した。保温した後、2-ME (1%) を含む分離緩衝液または含まない分離緩衝液中で反応混合液を90℃5分間おいて変性させた。それぞれの複合体を15%SDS-PAGEで電気泳動し、PVD F膜 (Millipore, Bedford, MA) に転写させた後、膜をブロッキングし、抗体を加えて反応させ、次にペルオキシダーゼの付加した抗マウスIgG (Amersham, Birmingham, UK) で反応させた。膜上の抗原を、ECL ウェスタンブロット検出キット (Amersham) で検出した。

【0034】間接蛍光抗体細胞染色

細胞を3.7%パラホルムアルデヒドと10%ウシ胎児血清を含むPBS中で室温 (RT) に20分間おいてスライドに固定化し、続いて(0.2%W/V) Triton X-100を含むPBSを用いて10分間の透過処理を行った。一次抗体 (TRXに対しては単クローン性11-mAbまたは21-mAb、Ref-1に対しては前述のポリクローン抗体) と室温で1時間反応させ、スライドを二次抗体 (TRXに対してはFITC結合抗マウスヒツジIgG (Amersham Life Science Inc.)、Ref-1に対してはTRITC結合抗ウサギヤギIgG (Sigma Chemical CO.)) と1時間反応させた。染色した細胞のスライドに、1mg/ml p-フェニレンジアミンを含む90%グリセロールを載せ、共焦点顕微鏡MRC600 (Bio-Rad Lab., Hercules, CA) を用いて細胞を観察した。

【0035】哺乳類ツーハイブリッド検定

哺乳類ツーハイブリッド検定は、Nerlov, C. & Ziff, E.B. (1995). EMBO J. 14, 4318-4328に記載された方法に従って行った。TRX、その変異型、またはRef-1のcDNAを、pCMX-GAL4 (Sadowski, I. & Ptashne, M. (1989) Nucleic Acid Res. 17, 7539) またはpCMX-VP16 (Perlmann, T., Rangarajan, P. N., Umesono, K. & Evans, R.M. (1993) Genes & Development 7, 1411-1422) (Umesono, K. から供与) と読み枠が合うように融合させた。1穴あたり2×10⁵細胞になるようにCOS7細胞を6穴プレートにまいた。リポフェクトアミン試薬によって、発現プラスミドを細胞に導入した。それぞれのトランスフェクションに際しては、1μgのレポーター構築物ptk-GALp×3-LUC (K. U. 供与) 及び内部対照としての1μgのβ-gal発現構築物と、1μgのGAL4融合プラスミド及び1μgのVP16融合プラスミドを同時に用いた。ptk-GALp×3-LUCには、チミジンキナーゼ最小プロモーターの前に3コピーのG

AL4結合部位が存在する。30時間後に細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を決定した。β-gal活性で標準化することによって、ルシフェラーゼの誘導の相対比を算出した。

【0036】実施例1

PMA刺激したHeLa細胞でのTRX及び/またはRef-1の発現

生体内でTRX及び/またはRef-1を過剰発現する結果AP-1の転写が活性化されるかどうかを観察した。AP-1結合部位を持つヒトコラゲナーゼIのプロモーターの活性を、ルシフェラーゼ活性を決定することで検定した。

【0037】それぞれの形質転換に際して、1μgのpCDSRα-野生型TRX (図2レーン2、4) または-TRX^{C32S/C35S} (レーン3、6) 発現プラスミド及び/または1μgのpRC/CMV-Ref-1 (レーン1、2、3) 発現ベクターと、1μgの-73/+63 Col-LUCを用いた。DNAの全量は、pRC/CMV (Invitrogen, San Diego, CA) を加えて3μgになるように調整した。16時間培養した後、PMA (30 ng/ml) を加えて細胞を24時間培養した。30時間後に細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を決定した。

【0038】結果を図2に示す。結果は3つの実験 (それぞれ2回行った) の平均であり、ルシフェラーゼ活性の相対比を、レーン4のPMA未処理 (PMA-) を1として示す。

【0039】PMA処理したHeLa細胞内で一時的に野生型TRXとRef-1 (図2レーン2) を同時発現させると、偽トランスフェクション (レーン4) に比べてルシフェラーゼ活性が4倍に上昇した。野生型TRX (レーン5) またはRef-1 (レーン1) の1つのみを発現させると、それぞれ1.5倍または2倍の活性化が起こった。還元活性を欠くTRX^{C32S/C35S}を発現させても、誘導は微少であった (レーン6)。

【0040】以上、過剰発現したTRX及びRef-1は、AP-1の転写活性を共同的に高める。

【0041】実施例2

PMA処理によるTRXの細胞内局在の移行

細胞内でのTRX及びRef-1の局在を観察した。TRXまたはRef-1に対する抗体を用いた間接蛍光法によってAP-1の転写の活性化が誘導されたHeLa細胞を、PMA処理した状態、またはPMA処理しない状態で解析した (Meyer, M., Schreck, R. & Baeuerle, P.A. (1993) EMBO J. 12, 2005-2015)。Ref-1は核内に局在し、PMA刺激の後にも核に留まる。対照的に、TRXはPMA刺激前は主に細胞質に局在し、PMA処理によって効率的に核に移行し、この過程は24時間以内にほとんど完了した (データ示さず)。

【0042】実施例3

in vitroでのTRXとRef-1との結合

酸化還元酵素が基質と直接相互作用する場合、これらの分子はジスルフィド架橋を通して中間体を形成する。そのため本発明者らは、システインの酸化によって遊離のメルカプト基をジスルフィドに換えるジアミドのような架橋試薬を用いて、それらの一過的な結合を観察できるのではないかと考えた。

【0043】そこで、TRXの5つのシステインのどれが分子間ジスルフィド結合を形成するのか決定するため、システイン→セリンまたはシステイン→アラニンの置換をした3つの変異型TRXをヘキサヒスチジン(6×His)標識した状態で精製した。6×His標識したRef-1及び種々の変異型TRX(図1)を、Ref-1存在下または非存在下でジアミドによって架橋処理した。反応後、還元条件または酸化条件下で複合体を電気泳動によって分離し、抗体で検出した。結果を、図3-5に示す。

【0044】還元的な条件下では、野生型のTRX及び全ての変異型TRX(TRXC32S/C35S、TRXC35S及びTRXC62S/C69S/C73S)はSDS-PAGEにおいて13kDaの1つのバンドとして移動する。野生型TRXまたはTRXC32S/C35Sをジアミドで処理すると複数のバンドが現れることから、多量体を形成していることが示唆される。しかしTRXC62S/C69S/C73Sの場合、ジアミド処理後には単量体しか検出されなかった(図3)。

【0045】Ref-1には7つのシステインがあり、還元的な条件下では単量体として泳動する(図4、レーン1、3、5、7)。酸化的な条件下では非還元状態よりも小さい新たなバンドが観察されるが、これは恐らく分子内ジスルフィド結合したRef-1の単量体の異なった状態を示すものだと考えられる(レーン2、4、6、8)。これ以外のさらに高分子量のものは見られなかったことから、チオールを標的とした酸化的条件下ではRef-1はシステインを介した多量体を形成しないことが示唆された。

【0046】次に、野生型及び変異型TRXをRef-1と混合して保温し、泳動パターンを解析した。酸化的条件で、野生型TRX、TRXC35A及びTRXC62S/C69S/C73Sのレーンにおいて、Ref-1(図4)及びTRX(図5)に対する抗体の両方とも、約50kDaの泳動距離に同一の新たなバンドを検出した(図4、レーン2、4、8;図5、レーン4のT+R)が、TRXC32S/C35Sに関するバンドは検出されなかった(図4、レーン6)。これらの結果から、試験管内でTRXとRef-1が共有結合によるヘテロ二量体を形成することが示され、さらにこの結合にTRXの活性中心のCys32が関与することが示唆された。

【0047】実施例4

哺乳類ツーハイブリッド検定法によるTRXとRef-1との物理的な結合

哺乳類ツーハイブリッド検定法は、タンパク質間相互作用を研究するために広く用いられており、酵母でのツーハイブリッドライブラリスクリーニングによって同定された相互作用を検証するのに特に有用である。また、この一過的な検定法を欠失変異誘発、部位特異的変異誘発等と一緒に用いることで、既知の2つのタンパク質間で相互作用するアミノ酸の位置を、迅速に決定することができる。ツーハイブリッド検定法でレポーター遺伝子の発現が検出されれば、2つの融合タンパク質は生きた細胞の核内で互いに結合していることが示唆される。

【0048】本発明者らは、核内でのTRXとRef-1との結合を生体内で検出するために、哺乳類ツーハイブリッド法を利用した。TRXまたはRef-1の相補的DNA(cDNA)をGAL4のDNA結合ドメイン(DBD)またはVP16の活性化ドメインの下流にサブクローン化した。これらの融合プラスミドを、レポーターのルシフェラーゼ遺伝子を持ったプラスミドとCOS7細胞内で同時発現させた。

【0049】図6で示すように、DBD-TRXまたはDBD-Ref-1をVP16と共にCOS7細胞内で発現させた時は、ルシフェラーゼ活性は観察されなかった(レーン1、3)。VP16-TRXまたはVP16-Ref-1をDBDと共に発現させた時は、微少な誘導しか検出されなかった(レーン2、4)。対照的に、野生型のTRX及びRef-1融合構築物を同時発現させると、ルシフェラーゼ活性が基底レベル(レーン7)の10倍以上も誘導された(レーン5、6)。

【0050】次に、変異型TRXを用いて、この相互作用に関わるシステイン残基の同定を試みた(図7)。触媒能を持たないシステインの三重変異体(TRXC62S/C69S/C73S)では、ルシフェラーゼ活性はなくなかった(レーン5)ことから、これらのシステインはTRXがRef-1と相互作用するための活性には必要ないということが示された。TRXC35A及びRef-1融合構築物を同時発現させると、ルシフェラーゼの誘導が観察された(レーン4)が、発現の程度は基底レベル(レーン1)の6-7倍程度であった。一方、TRXC32S/C35SとRef-1融合構築物を同時発現させても、ルシフェラーゼの誘導は起こらなかった(レーン3)。

【0051】以上、in vitro(実施例3)及びin vivo(実施例3)のデータによって、TRXとRef-1との直接的な相互作用は活性中心のCys32およびCys35を介して起こることが示された。

【0052】なお、図6および7では、 β -gal活性で標準化することによって、ルシフェラーゼの誘導の相対比を算出した。結果は3つの実験(それぞれ2回行った)の平均であり、ルシフェラーゼ活性の相対比を、レ

ーン1を基底として示す。

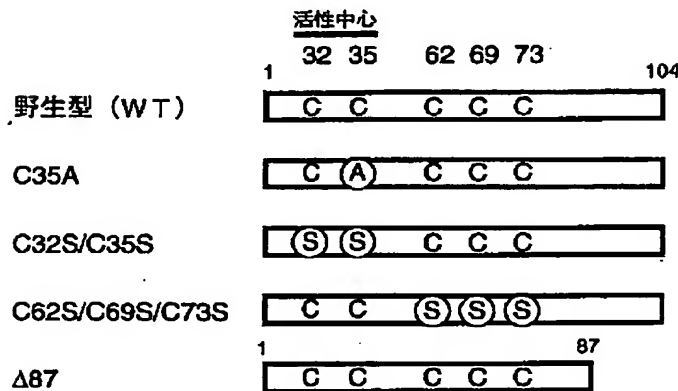
【0053】本発明者らはさらに、置換変異体に加えて、TRXのアミノ酸残基88以降のC端領域を除去した変異体TRX Δ 87(図1)を、作製した。TRX Δ 87は5つのシステイン全てを保持しているが、ジチオール還元活性は失っている。TRX Δ 87及びRef-1融合構築物を同時発現させても、ルシフェラーゼ活性の顕著な誘導は見られなかった(図7 レーン6)。この結果は、TRXの還元活性とTRXのRef-1との相互作用には、活性部位のCys残基のみでなく、TRXのCOOH末端も必要であることを示唆している。

【0054】

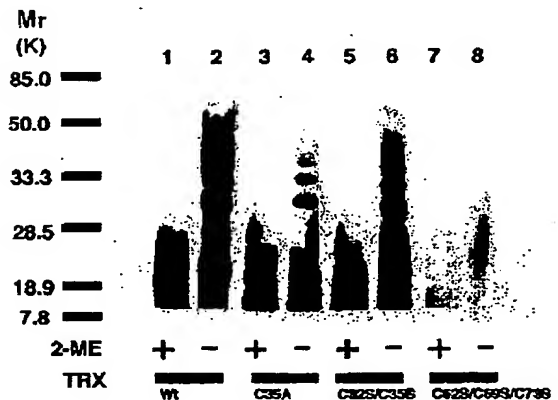
【効果】本発明により、非還元条件下で安定にしたTRX、並びに前記TRXとRef-1とがS-S結合してなるAP-1の転写活性を増強する因子が提供された。本発明の因子は、TRXとRef-1とがTRXの活性部位でS-S結合して、AP-1の転写活性を促進させるものである。

【図面の簡単な説明】

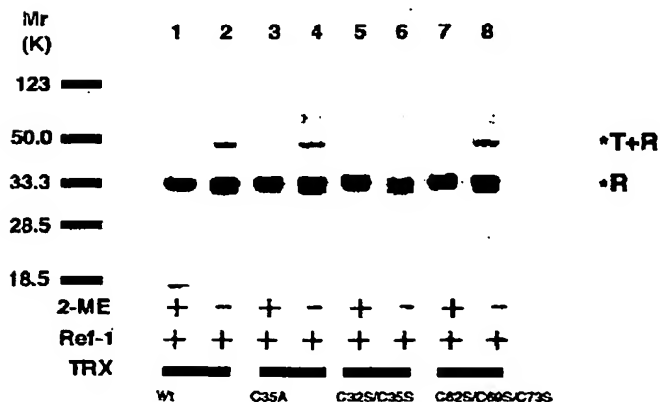
【図1】



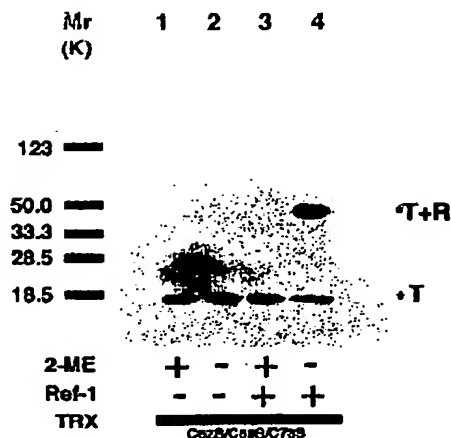
【図3】



【図4】



【図5】



【図1】 図1は、当実験で用いた変異型TRX構築物の模式図を示す。

【図2】 図2は、PMA処理したHeLa細胞で、TRX及び/またはRef-1の一時的な発現がAP-1の活性化に与える影響を示す。

【図3】 図3は、抗TRX抗体を用いた、種々のTRX複合体のウエスタンブロット解析を示す。

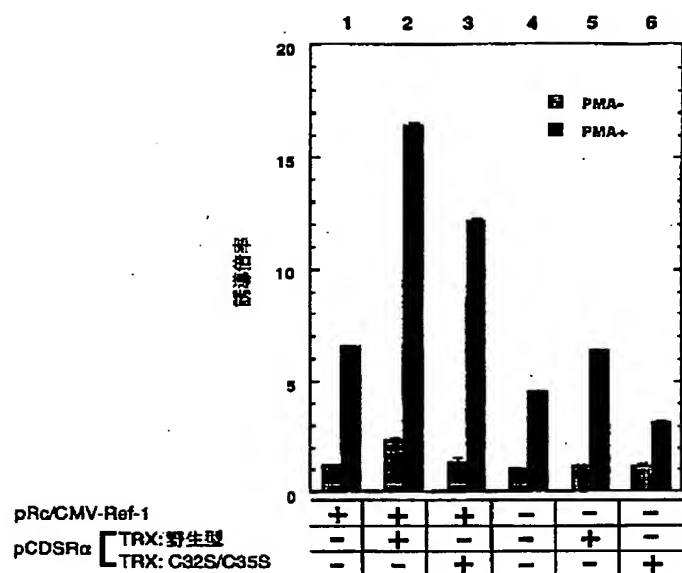
【図4】 図4は、抗Ref-1抗体を用いた、種々のTRX及びRef-1複合体のウエスタンブロット解析を示す。

【図5】 抗TRX抗体を用いた、種々のTRX及びRef-1複合体のウエスタンブロット解析を示す。

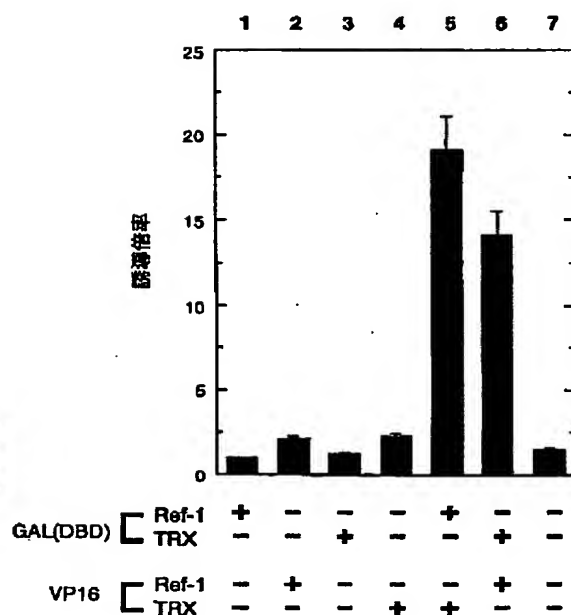
【図6】 図6は、COS7細胞での哺乳類ツーハイブリッド検定法による、野生型TRXとRef-1の物理的相互作用を示す。

【図7】 図7は、COS7細胞での哺乳類ツーハイブリッド検定法による、変異型TRXとRef-1の物理的相互作用を示す。

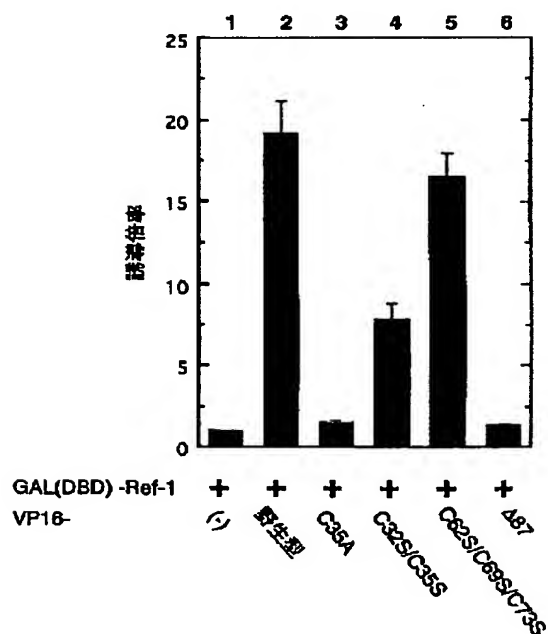
【図2】



【図6】



【図7】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

識別記号

F 1

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:19)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.